

Aus der Abteilung für klinische Immunologie des Universitätskrankenhauses
Erlangen-Nürnberg
Vorstand: Professor Dr. F. Scheiffarth

Verhalten der elektrophoretisch,
biochemisch und immunologisch
definierbaren Proteine des Sputums
unter Sekretolyse

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

hohen Medizinischen Fakultät

der

Friedrich-Alexander-Universität

zu Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von

Matthias Fischer

aus Gera

1970



Referent: Prof. Dr. F. Scheiffarth

Dekan: Prof. Dr. H. Valentin

Tag der mündlichen Prüfung: 30. 7. 1970

VERHALTEN DER ELEKTROPHORETISCH, BIOCHEMISCH UND IMMUNOLOGISCH DEFINIERBAREN PROTEINE DES SPUTUMS UNTER SEKRETOLYSE*

H. GÖTZ UND M. FISCHER

*Forschungslabor für Transplantations- und Tumorummunologie der Chirurgischen Universitätsklinik der Freien Universität Berlin** und Abteilung für klinische Immunologie des Universitätskrankenhauses Erlangen-Nürnberg (Bundesrepublik Deutschland)****

(Eingegangen den 15. May, 1970)

SUMMARY

Behaviour of Proteins in Sputum after Secretolysis

Sputum samples of 20 patients with allergic asthma and the sputum pool of 10 healthy men were analysed before and after the application of a secretolytic agent. Each sputum sample was homogenized, the soluble proteins separated by agar- and immunoelectrophoresis and then characterized biochemically.

After secretolysis all primary demonstrable protein components showed a marked increase, especially the group of γ -globulins. These components proved as PAS-positive proteins, as fractions with LDH- as well as esterase activity and among the immunoglobulins as γ A- and γ G-fractions.

The results are discussed in the light of the existing literature.

Bisherige, von verschiedener Seite vorgenommene Untersuchungen des Sputums bzw. Tracheobronchialsekrets des Gesunden sowie des Patienten mit Erkrankungen des Bronchopulmonalsystems haben, ungeachtet der zumeist unterschiedlichen Versuchsanordnung und Methodik, eine Reihe gut übereinstimmender Befunde ergeben. Dies bezieht sich vor allem auf den Konstellationstyp des elektrophoretisch differenzierbaren Proteinmusters^{2a,b,4b,6,8,10,19,22a,b,23,25,27,32,37}.

Nach diesen Angaben finden sich im Sputum Eiweisskomponenten, die auf Grund ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit im Vergleich zu den Proteinen eines menschlichen Normalserums im wesentlichen einer Albuminfraktion und einem β_1/γ -Globulinkomplex entsprechen, wobei das β_1 -Globulin vielfach noch gut von den γ -Globulinen abgrenzbar erscheint. Der γ -Globulinbereich lässt zumeist zwei Komponenten erkennen. Darüber hinaus wurden wiederholt auch γ -Nachfraktionen, d.h. Proteinkomponenten mit geringerer elektrophoretischer Wanderungsgeschwindigkeit-

* Broncho-Sekretolytikum, N-Cyclohexyl-N-methyl-(2-amino-3,5-dibrombenzyl)-ammoniumchlorid, "Bisolvon" der Fa. Dr. Karl Thomae GmbH, Biberach an der Riss, D.B.R.

** Direktor: Prof. Dr. E. S. Bücherl.

*** Vorstand: Prof. Dr. F. Scheiffarth.

keit als das physiologische γ -Globulin, beschrieben^{2a, 22a, 27, 32}. Proteine vom Typ der α -Globuline wurden unter tabellarisch zusammengestellten Ergebnissen regelmässig aufgeführt⁶ und insbesondere auf Grund immunoelektrophoretischer und quantitativer immunochemischer Analysen nachgewiesen^{22a, b, 23, 25, 32}. Über ihren relativen Anteil an dem Proteinmuster des Sputums bestehen jedoch Diskrepanzen. Immunelektrophoretische Analysen des neueren einschlägigen Schrifttums²³ ergaben insgesamt 10 serumidentische Proteinkonstituenten, unter ihnen auch die wichtigsten γ -Immunglobuline IgA, IgG und IgM. Biochemische Analysen zur Charakterisierung der einzelnen darstellbaren Serumproteine erbrachten den Nachweis von Glykoproteiden bzw. Mucopolysacchariden^{1, 7, 25}, ferner von esteraseaktiven Fraktionen^{23, 25}, sowie von Isoenzymen der LDH (Lactatdehydrogenase)⁵. Lipoproteide wurden dagegen nicht oder nur spurenhaf nachgewiesen^{23, 25}. Darüber hinaus wurden in detaillierten Sputumuntersuchungen Lactoferrin^{22a, b}, Blutgruppenfaktoren^{4a}, makromolekulare Proteine³, sowie Speichelamylase^{22a} nachgewiesen.

Diese Sputumbefunde erlangen nicht nur für die Protein-Grundlagenforschung sondern auch für die klinische Medizin als Ausgangswerte im Rahmen von Verlaufsuntersuchungen zur Prüfung des Therapie-Erfolges nach Sekretolyse an Bedeutung. Hier interessiert vor allem die Frage nach quantitativen und möglicherweise auch qualitativen Änderungen innerhalb des Proteinverteilungsmusters des Schleimhautsekrets. Befunde mehrerer Arbeitsgruppen, die sich dieser Frage mit vergleichenden Sputumanalysen bereits intensiv angenommen haben^{5, 6, 23, 26, 27}, erwiesen sich indessen als uneinheitlich. So beschreiben Nicolas und Biserte^{2a, 27} unterschiedliche Sputumproteinmuster in Abhängigkeit vom Schleimhautprozess, während Nadolny und Büchner²⁶, ferner Bürgi und Mitarb.^{5, 6} sowie Maurer^{23, 25} relativ gute Übereinstimmung in ihren, unabhängig voneinander inaugurierten Ergebnissen aufweisen. Diese Autoren konnten im ganzen gesehen keine qualitativen Änderungen sondern lediglich quantitative Relationsverschiebungen des Proteinmusters von Sputen bei verschiedenen Erkrankungen des tracheobronchopulmonalen Systems bzw. unter Sekretolyse feststellen.

In vorliegender Arbeit sollten deshalb nochmals Sputumanalysen vorgenommen werden zur Aufklärung des normalen Protein- und Enzymverteilungsmusters löslicher Eiweisskonstituenten. Es sollten ferner die Veränderungen der Serumkomponenten unter dem Einfluss einer sekretolytischen Behandlung aufgezeigt werden.

UNTERSUCHUNGSGUT, VERSUCHSANORDNUNG UND METHODIK

1. Untersuchungsgut

Es wurden insgesamt 30 Sputumproben untersucht. Unter ihnen befanden sich 10 Sputen von Gesunden sowie 20 Sputen von Patienten mit asthmoider Bronchitis, wobei bei einem der Kranken zugleich ein Lupus erythematodes disseminatus bestand. Das Patientengut bestand aus genau 10 männlichen und 10 weiblichen Kranken.

2. Versuchsanordnung

Jede Sputumprobe wurde in einem speziell angefertigten Homogenisator* fein verteilt und ohne Differenzierung in Gel- und Solphase unverzüglich für die Analysen

* Homogenisator, Braun, Melsungen.

verwendet. Die Patientensputen wurden für die weiteren Untersuchungen einzeln verarbeitet. Von den 10 Sputen Gesunder wurde nach Homogenisierung der Einzelproben ein Pool hergestellt. Das galt prinzipiell für die Untersuchungen vor Sekretolyse als auch für die Analysen nach Sekretolyse. Im einzelnen wurden die Proben agaroelektrophoretisch getrennt und in Kombination mit biochemischen sowie immunologischen Techniken näher charakterisiert. Zur Anwendung kamen die Proteinfärbung mit Amidoschwarz 10 B, die Glycoproteidfärbung mit PAS, die Lipoproteidfärbung mit Sudanschwarz B, die Nachweismethoden für esteraseaktive, LDH-aktive sowie amylaseaktive Komponenten. Die immunologische Differenzierung der Antigenkomponenten der Sputumproben erfolgte mit Hilfe der Immunelektrophorese unter Verwendung eines polyvalenten Anti-Humanserums sowie verschiedener monovalenter Antiseren. Schliesslich wurde von jedem Patienten die Serumweißskonstellation mittels der Celluloseacetatfolien-Elektrophorese festgestellt.

3. Methodik

(a) *Gewinnung und Aufbereitung des Sputums.* Von jedem Patienten wurden eine Probe vor und zwei Proben nach Gabe des Sekretolytikums *N*-Cyclohexyl-*N*-methyl-(2-amino-3,4-dibrombenzyl)-ammonium-chlorid durch Expektoratation gewonnen, und zwar eine Probe am fünften, die andere am zehnten Tag nach Beginn der sekretolytischen Therapie. Das Sekretolytikum wurde in Tabletten zu 4 mg in folgender Dosierung verabreicht: Erster bis einschliesslich dritter Tag 3×2 Tabletten, vierter und fünfter Tag 2×2 Tabletten und ab sechstem Tag 3×1 Tablette.

Der Homogenisator, mit dem die Proben aufbereitet wurden, bestand aus einem zylindrischen Gefäss, in das ein Kolben mit nur geringem Radialspiel eingepasst war. Der Kolben führte mit Hilfe eines Elektromotors eine hochtourige Drehbewegung, sowie langsame, von Hand erzeugte Hubbewegungen aus. Durch zweimaligen Hub wurde jede Sputumprobe viermal vollständig zwischen Kolben und Zylinderwand durchgepresst.

(b) *Agarelektrophorese.* Die einfache Elektrophorese im Agar gel wurde nach den grundsätzlichen Angaben von Grabar-Williams^{15b,16,18} vorgenommen. Im einzelnen wurden Agarplatten mit den Abmessungen von 12 cm Länge, 2.6 cm Breite, 0.2 cm Höhe und einer Auftragestelle von 1.4 cm Länge und 0.3 cm Breite verwandt. Die dabei notwendigen Auftragemengen betrugen 0.084 ml.

Die Mischung des Sputums mit Agar* erfolgte im Verhältnis 2:3. Bei der Serumaufbereitung wurden 2 T Serum + 3 T Aqua dest. + 5 T gepufferter Agar im Wasserbad bei 38° gemischt. Als Agarpuffer sowie als Elektrophoresepuffer wurde ein Natriumacetatpuffer pH 8.6, Ionenstärke $\mu = 0.05$ verwendet. Die Spannung in der Kammer wurde bei 150 V gehalten. Die Laufzeit betrug bei 7 Platten ca 3 Std.

(c) Biochemische Reaktionen.

1. *Proteinfärbung mit Amidoschwarz 10 B.* Für die Proteinfärbung wurde Amidoschwarz 10 B^{18,36} verwendet.

2. *Kohlenhydratfärbung (PAS-Färbung).* Es wurde im wesentlichen nach den Angaben von Maurer²⁴ vorgegangen.

3. *Lipoproteidfärbung.* Die Lipoproteidfärbung wurde mit Sudanschwarz B nach den Angaben des einschlägigen Schrifttums vorgenommen^{18,36}.

* Reinagar der Behringwerke, Marburg/Lahn; in 1.5%iger Konzentration verwendet.

4. *Nachweis der LDH.* Hier wurde im Prinzip nach den Angaben von Van der Helm¹⁷ gearbeitet.

5. *Esterasenachweis.* Es wurden Indoxylacetat zum Nachweis der Cholinesterase sowie β -Naphthylacetat zur Darstellung der Aliesterasen verwendet^{15a,31,35}.

6. *Amylasenachweis.* Der Amylasenachweis erfolgte nach der üblichen Jod-Stärke-Reaktion^{18,30}, wobei an den Stellen des Stärkeabbaus durch die Amylase weisse bis rötliche Aussparungen im Bereich der β/γ -Globuline offensichtlich wurden.

7. *Die Dokumentation der Farbreaktionen bzw. der gefärbten Fraktionen oder der Farbdefekte (Amylase)* erfolgte durch Photometrie mit Hilfe eines Integralschreibers*.

(d) *Immunelektrophorese.* Bei der Immunelektrophorese wurde nach den Angaben von Grabar und Williams^{12,15a,16,33,38a} bzw. Scheidegger^{29a,b} vorgegangen. Neben der üblichen Mikromethode auf Objektträgern von 7.5 cm Länge und 2.5 cm Breite kamen hier auch Agarplatten von 12 cm Länge, 2.6 cm Breite und 0.3 cm Höhe zur Anwendung. Die benötigten Auftragemengen an Sputum betrugen bei einem Durchmesser von 0.2 cm der Auftragestelle jeweils 0.006 ml. Der Längskanal zur Aufnahme des Antiserums wurde 0.2 cm breit gehalten und lag in einem Abstand von 0.5 cm von der Auftragestelle entfernt. Für die Elektrophoresekammern sowie für die Aufbereitung des Agars wurde ein Natriumacetatpuffer pH 8.6, Ionenstärke $\mu = 0.05$ verwendet. Die Elektrophoresedauer bei den oben erwähnten grösseren Platten betrug zwischen 2 und 2½ Std., die Trennzeit bei Objektträgern ca 1¼ Std. Als Antiserum wurden ein polyvalentes Anti-Humanserum** sowie monoklonale Antiseren*** gegen folgende Serumproteine verwendet: α_1 -Antitrypsin, α_2 -Haptoglobin, α_2 -Makroglobulin, β_1 -Hämopexin, β_1 -Transferrin, β_{1c}/β_{1A} -Globulin, γ A-Globulin, γ G-Globulin, γ M- sowie γ D-Globulin.

Die Dokumentation wurde durch Photographie (Kontaktverfahren oder Auflichtphotographie) vorgenommen.

(e) *Elektrophorese auf Celluloseacetat-Folien.* Methodisch wurde nach den Angaben von Kohn^{20a,b,c}, hier unter Verwendung der Elektrophoresekammer Bender und Hobein† sowie der von der gleichen Firma gelieferten CA-Folien† vorgegangen. Für die Proteindarstellung wurde pro Analyse eine Serummenge von 8 μ l aufgetragen.

ERGEBNISSE

(1) Einfache Agarelektrophorese

(a) *Amidoschwarzfärbung.* Mit der Amidoschwarzfärbung konnten bei allen hier untersuchten Patientenseren vor Sekretolyse 4 sicher abgrenzbare Fraktionen nachgewiesen werden; entsprechend ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit, handelt es sich hierbei um Albumin, eine α_1 -Fraktion, eine β -Globulin-Fraktion sowie zwei γ -Fraktionen. In einzelnen Fällen war darüber hinaus eine fünfte Komponente an Stelle von α_2 -Globulinen zu objektivieren, in 2 der Sputumproben ausserdem eine Fraktion jenseits (kathodenwärts) der Auftragestelle. Die Proteinmuster der Sputen vor Sekretolyse zeigten im Vergleich zu den Befunden nach Sekretolyse keine sicheren

* Integralschreiber der Fa. Zeiss, Oberkochen; Filter FE 53.

** Travenol-International, München.

*** Behring-Werke, Marburg/Lahn.

† Fa. Dr. Bender und Dr. Hobein, München.

qualitativen Änderungen. Es traten die darstellbaren löslichen Proteine quantitativ stärker in Erscheinung, wovon insbesondere die langsam wandernden Komponenten stärker betroffen wurden (Abb. 1).

Die Befunde des Pools der 10 gesunden Personen wiesen vor Sekretolyse nur eine weit anodisch gewanderte Fraktion (mit Albumin vergleichbar) sowie einen nicht differenzierten und schwach gefärbten Komplex um die Auftragsstelle auf. Nach

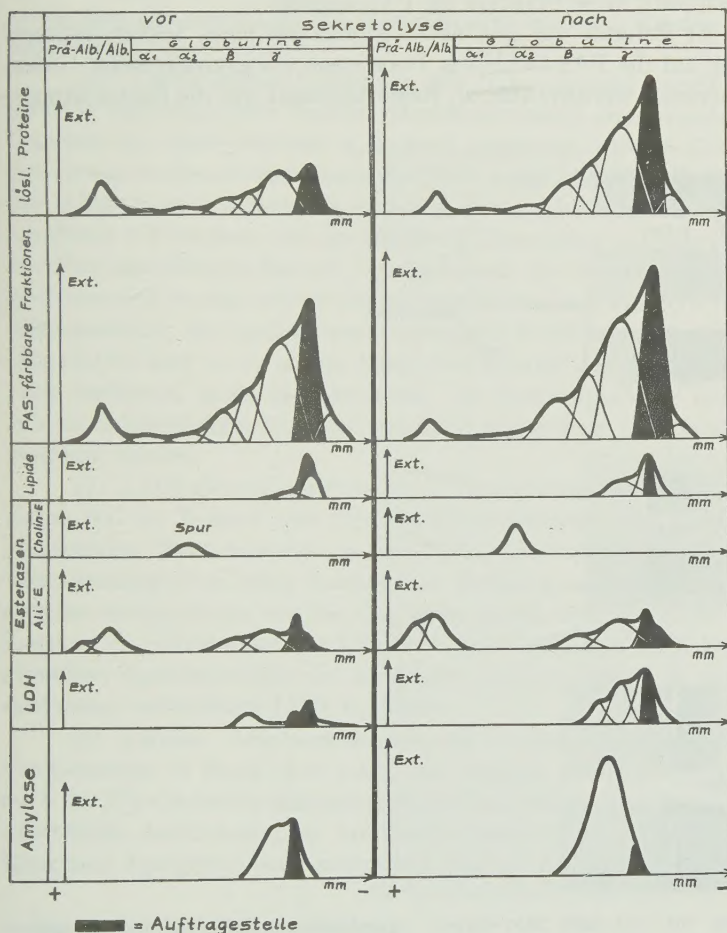


Abb. 1. Sputumanalysen vor und nach Sekretolyse. Diagramme der agaroselektrophoretisch getrennten löslichen Proteine mit nachfolgender biochemischer Charakterisierung der darstellbaren Fraktionen.

Anmerkung: Die Gradienten für die amylaseaktiven Fraktionen, die als "Negativkurven" (Aufhellungszonen in der blauviolettten Jod-Stärke-Färbung) erscheinen, wurden hier umprojiziert.

Gabe eines Sekretolytikums kam es zu einer stärkeren Farbreaktion der anodisch gewanderten Komponente und ausserdem zum Nachweis eines Globulins mit der Wanderungsgeschwindigkeit von β/γ -Globulinen; schliesslich war auch der Bereich der Auftragsstelle stärker gefärbt.

(b) Färbung mit PAS. Bei PAS-Färbung der einzelnen Präparate fiel in allen

pathologischen Fällen im Bereich der Auftragestelle eine intensive Farbreaktion auf. Dieser intensiv gefärbte Komplex liess vielfach 2 Subfraktionen erkennen. Darüber hinaus war im Bereich der Albumine sowie in der Zone der β_1 -Globuline eine gefärbte Fraktion zu erkennen; sie stellten sich allerdings als schmalbasige, scharf begrenzte Bande dar. Somit konnten mit PAS-Färbung unter Einbeziehung der Auftragestelle 4-5 Komponenten differenziert werden (Abb. 2). In den zwei oben beschriebenen Sputumproben mit zusätzlicher Komponente im extrem kathodischen Elektrophoresebereich erwies sich auch diese Fraktion als PAS-sensibel.

Bei Vergleich der Befunde vor und nach Applikation eines Sekretolytikums kann auch mit Bezug auf die PAS-färbbaren Fraktionen ein grundlegender Unterschied nicht wahrgenommen werden (Abb. 2). Bemerkenswert war die Beobachtungs-

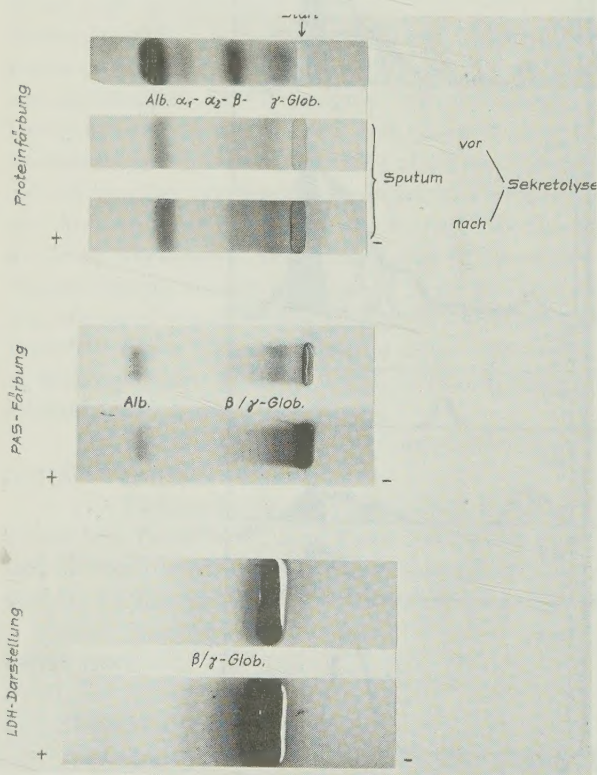


Abb. 2. Sputumanalysen vor und nach Sekretolyse. Agarelektrophoretische Untersuchungen: Oben: Gegenüberstellung eines pathologischen Serums den Sputumproben vor und nach Sekretolyse des gleichen Patienten; Proteinfärbung mit Amidoschwarz 10 B. Mitte: Sputumproben des gleichen Patienten nach PAS-Färbung. Unten: Sputumproben des gleichen Patienten nach Reaktion zum Nachweis Lactatdehydrogenase-aktiver Konstituenten.

tatsache, dass sich relativ stärkere Schwankungen zeigten als im Proteinmuster, so dass im Vergleich zu den Sputumbefunden vor Behandlung exakt verwertbare Relationsunterschiede nicht abzuleiten waren. Insbesondere zeigten sich keine qualitativen Änderungen.

Unter den Befunden des Pools Gesunder waren ebenfalls keine qualitativen Abweichungen der Proben nach Sekretolyse im Vergleich zu den Befunden vor Be-

handlung zu erfassen. Insgesamt war auch hier, wie beim Proteinmuster, eine wesentlich geringere Ausbeute elektrophoretisch differenzierbarer Komponenten festzustellen; hier konnte überhaupt nur um die Auftragestelle eine schwache Farbreaktion nachgewiesen werden.

(c) *Lipoproteide*. Der Lipoproteidenachweis mit Sudanschwarz B gelang in sämtlichen Proben nur spärlich, d.h. es fand sich vielfach nur eine mehr oder weniger intensiv gefärbte, zumeist jedoch nur schwach getönte Farbzone an der Auftragestelle. Das gilt sowohl für die Normalsputen wie auch für die Untersuchungen nach Sekretolyse.

(d) *Esteraseaktive Fraktionen*. Mit Indoxylacetat konnte in 3 Fällen der untersuchten pathologischen Sputen übereinstimmend eine einzelne, schwach gefärbte Fraktion im umschriebenen α_2 -Bereich aufgezeigt werden. Dieser Befund liess sich jedoch nur in den Proben nach der Gabe eines Sekretolytikums demonstrieren. Mit β -Naphthylacetat dagegen konnten in den pathologischen Sputen bereits vor Behandlung 2 Komplexe mit spezifischer Farbreaktion nachgewiesen werden; einer im Präalbumin/Albumin-Bereich, der andere an der Auftragestelle selbst. Der anodisch gewanderte Komplex war in den meisten Fällen zwar in zwei schwache Subfraktionen differenzierbar, der kathodenwärts gelegene breitbasig und nicht unterteilbar. Nach Sekretolyse kam es zu einem deutlichen Anstieg der Pseudocholinesterasen, jedoch ohne Auftreten neuer Komponenten. Im Sputumpool der Gesunden konnte lediglich nach Sekretolyse eine weit anodisch gewanderte esteraseaktive Fraktion nachgewiesen werden.

(e) *LDH-aktive Komponenten*. In den untersuchten Patientensputen vor Sekretolyse war im Bereich von β/γ -Globulinen zumeist eine LDH-aktive Komponente nachweisbar. Nach Applikation eines Sekretolytikums fiel in sämtlichen Analysen das Inerscheintreten einer zusätzlichen Fraktion auf, in 2 Fällen konnten sogar 3 Isoenzyme nachgewiesen werden. Sie lagen sämtlich in der Zone zwischen der in den Sputen vor Sekretolyse beschriebenen LDH-Fraktion und der Auftragestelle. Die gepoolten Sputumproben der Gesunden zeigten weder vor noch nach Sekretolyse eine sicher definierbare LDH-Fraktion.

(f) *Amylase*. Amylaseaktivität war in allen Sputumproben von Patienten wie von Gesunden in Form eines mehr oder weniger scharf ausgesparten Bezirks im Bereich der β/γ -Globuline demonstrierbar. Nach Sekretolyse konnte in allen Fällen eine wesentliche deutlichere bzw. breitere Aussparung im tiefdunkelblauen (Jod-Stärke-Reaktion) Agargrund wahrgenommen werden (Abb. 1).

2. Immunelektrophoretische Befunde

Die immunelektrophoretischen Befunde waren hinsichtlich ihrer Zahl und Intensität der verschiedenen Präzipitationssysteme in den verschiedenen Einzelproben der Patienten unterschiedlich ausgefallen. Mit Regelmässigkeit konnten jedoch im Sputum vor Applikation eines Sekretolytikums insgesamt 6 Komponenten nachgewiesen werden. Auf Grund ihrer elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit und ihrer Diffusionseigenschaften handelt es dabei um eine Präalbuminfraktion, das Albumin, eine relativ langgestreckte Präzipitationslinie, die sich vom Albumin- bis in den β_1 -Globulinbereich ausdehnt, eine weitere im α_1 -Globulinbereich gelegene jedoch kürzer verlaufende Fraktion, das Transferrin, sowie 2 Präzipitationslinien vom Typ der γ -Globuline. Das typische Präzipitationsphänomen für die im menschlichen

Serum nachweisbare γ M-Fraktion konnte in den Ausgangsanalysen der Patienten nicht gefunden werden. Nach Sekretolyse traten die erwähnten Fraktionen wesentlich deutlicher in Erscheinung, das trifft insbesondere für das γ -Globulinsystem zu, an welchem nunmehr eine Anreicherung der γ A- und wahrscheinlich auch der γ G-Fraktion objektivierbar wurde; die γ G-Fraktion war hier allerdings im Vergleich zu derselben des menschlichen Serums insgesamt weniger intensiv und ausserdem verkürzt nachweisbar. Darüber hinaus traten die serumidentische β_1 -Hämopexinfraktion, die mit dem β -Glycoprotein vergleichbare, sowie eine zuinnerst gelegene α_2 -Fraktion (α_2 -Makroglobulin) und in 2 Fällen ein schwaches, verwaschenes Präzipitat der γ M-Fraktion nach Sekretolyse in Erscheinung.

Die ergänzenden Untersuchungen mit monovalenten Antiseren bestätigten im wesentlichen die Existenz der vorerwähnten serumidentischen Fraktionen, wobei allerdings in nicht eingegangenen Einzelproben der Nachweis für das Hämopexin, für IgM, IgD sowie des β_{1C}/β_{1A} -Globulins und auch des α_2 -Haptoglobins nicht gelang.

Im Sputumpool der Gesunden konnten vor Sekretolyse Albumin und γ A-Globulin nachgewiesen werden. Nach Applikation eines Sekretolytikums trat die γ A-Fraktion stärker in Erscheinung, darüber hinaus wurden eine α_1 -Globulinfraktion, das schwache Präzipitat eines α_2 -Globulin sowie ein ebenfalls nur schwach darstellbares α_2/β_1 -Globulin wahrnehmbar (Abb. 3a).

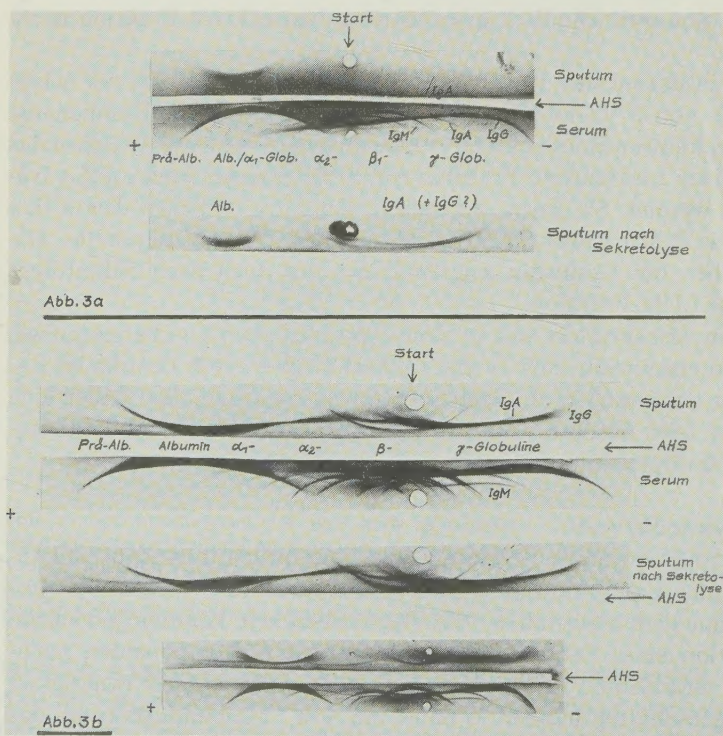


Abb. 3, a und b. Immunelektrophoretische Befunde von Sputumproben Gesunder (oben) vor und nach Sekretolyse (Abb. 3a) sowie von Sputumproben eines Patienten mit asthmoider Bronchitis (unten), ebenfalls vor und nach Sekretolyse.

3. Vergleich der Serumproteinconstellation mit dem jeweiligen Sputumproteinmuster

Wie aus Tabelle I zu ersehen ist, finden sich im Serum der Patienten wahllos Dysproteinämietypen vorwiegend mit α - und γ -Globulinvermehrung und in einzelnen Fällen auch mit vorherrschender β/γ -Vermehrung. Im Sputum konnte dagegen im vorliegenden Krankengut nur ein Verteilungsmuster mit nur geringfügigen quantita-

TABELLE I

BEFUNDE DER ELEKTROPHORESE AUF CELLULOSEACETATFOLIEN DER VERSCHIEDENEN PATIENTENSEREN

Lfd. Nr.	Name d. Pat.	Geschl.	Alb.	Globuline				Alb./Glob.
				α_1	α_2	β	γ	
1	S.B.	O	60.5	3.5	10.2	11.4	14.4	1.53
2	W.R.	O	65.7	3.7	9.0	9.7	11.9	1.92
3	R.B.	O	59.8	3.8	8.8	11.3	16.3	1.49
4	F.M.	O	64.1	2.9	9.7	12.6	10.7	1.79
5	L.W.	O ₂	58.9	1.9	6.5	12.1	20.6	1.44
6	D.W.	O ₂	56.6	4.4	10.6	14.2	14.2	1.31
7	H.F.	O ₂	59.5	2.6	12.1	8.6	17.2	1.47
8	B.U.	O ₂	67.2	4.0	7.2	10.4	11.2	2.06
9	A.S.	O ₂	64.5	2.7	7.1	12.4	13.3	1.98
10	W.M.	O ₂	44.0	6.0	12.8	14.1	23.1	0.79
11	V.R.	O ₂	48.7	6.7	13.3	18.7	12.6	0.95
12	K.P.	O ₂	44.1	5.5	15.7	15.7	19.0	0.79
13	S.E.	O ₂	49.6	5.1	14.6	10.3	20.4	0.99
14	H.L.	O ₂	52.6	4.2	11.6	13.7	17.9	1.11
15	R.M.	O ₂	55.4	3.5	10.6	12.9	17.6	1.24
16	S.J.	O ₂	59.6	3.5	10.6	14.0	12.4	1.47
17	P.E.	O ₂	44.2	5.3	11.5	15.3	23.7	0.79
18	S.L.	O ₂	45.9	6.5	13.7	12.9	21.0	0.85
19	G.J.	O ₂	48.0	5.3	12.0	12.0	22.7	0.92
20	K.S.	O ₂	67.2	3.1	6.3	8.6	14.8	2.06

tiven Verschiebungen zwischen Albumin und β/γ -Komplex, hier zumeist mit einer quantitativ stärkeren Darstellung der langsam wandernden Proteine festgestellt werden.

DISKUSSION

Die vorliegenden Analysen von Sputumproben vor und nach einer sekretolytischen Behandlung von Patienten mit vorwiegend asthmoider Bronchitis haben gezeigt, dass das Sputum der nicht behandelten Patienten im Vergleich zum Sputum der Gesunden sich hinsichtlich seiner löslichen und elektrophoretisch bzw. immun-elektrophoretisch differenzierbaren Proteine deutlich unterscheidet.

Während in den Patientensputen ein Proteinkonstellationstyp mit dem Nachweis einer Präalbumin-Fraktion, einer Albuminfraktion, geringer Quantitäten von α_1 - und α_2 -Globulinen und eines relativ starken Anteils von Globulinen des β/γ -Globulinsystems zur Darstellung gelangt, zeigt sich im Sputum von Gesunden praktisch nur eine, dem Serumalbumin vergleichbare, Fraktion sowie ein nicht differenzierbarer Komplex um die Autragestelle. Gemessen an der PAS-Färbung, handelt es sich bei den β/γ -Globulinen um Glycoproteide bzw. Mucopolysaccharide. PAS-positive Reaktionen wurden in den pathologischen Sputen aber auch im Bereich

der Albumine und dem einer α_2 - bzw. β_1 -Fraktion gefunden. Lipide wurden nur am Ort der Auftragestelle nachweisbar.

Cholinesterasen wurden im Bereich der α_2 -Globulinfraktion in pathologischen Sputen nachgewiesen. Aliesterasen fanden sich als zwei elektrophoretisch unterschiedlich gewanderte Komplexe, die sich von der Position der esteraseaktiven Komponenten eines menschlichen Serums unterscheiden. An LDH-aktiven Komponenten wurden zumeist 2 Isoenzyme im Bereich der β/γ -Globuline fassbar. Schliesslich wurde in allen Fällen, pathologischen wie Normal Sputen, eine amylaseaktive Zone im β/γ -Bereich gefunden. Diese Ergebnisse stehen sowohl mit Bezug auf die pathologischen, als auch mit Bezug auf die normalen Sputen in guter Übereinstimmung mit Befunden der einschlägigen Literatur^{2a, 5, 6, 7, 22a, 23, 25, 23, 32}.

Nach Verabreichung eines Sekretolytikums konnte in allen Fällen eine deutliche Zunahme der β/γ -Proteine und der β/γ -Glycoproteide auf Kosten der im Albuminbereich gewanderten Fraktionen wahrgenommen werden, desgleichen eine Zunahme der Aliesterasen. Die Befunde der LDH-aktiven Komponenten weisen darauf hin, dass unter Sekretolyse nicht nur eine quantitative Vermehrung der Fermentfraktionen sondern auch eine Liberierung von Isoenzymen erfolgt. Schliesslich wurde eine deutliche Zunahme der Amylaseaktivität festgestellt.

Die biochemischen Analysen beweisen also, dass unter Sekretolyse vor allem PAS-positive Proteine sowie einzelne Fermentsysteme vermehrt abgeschieden werden. Unter Berücksichtigung der Untersuchungsergebnisse von Gieseking und Baldamus (Lit. I, II) entstammen diese Proteine offenbar den intakten Schleimhautzellen, wobei die Freisetzung entweder über eine gesteigerte Permeabilität^{5, 9} oder über eine Neubildung bzw. Aktivierung dieser Proteine innerhalb der funktionstüchtigen Schleimhaut geschieht. Demnach ist sicher auch die γ -Globulinanreicherung durch eine aktive Freisetzung aus der Tracheobronchialmucosa und nicht etwa durch destruiertes Schleimhautzellmaterial bedingt. Die starke Anreicherung der Amylase nach Gabe eines Sekretolytikums kann selbstverständlich zum Teil durch Beimengungen von Speichelamylase bedingt sein. Ungeachtet ihrer Organherkunft handelt es sich bei dieser in allen Sputumproben nachgewiesenen Amylase auf Grund ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit^{13, 14} um Speichel- und nicht um Pankreasamylase. Dies wird im übrigen auch von anderen Autoren angenommen^{22a}.

Die immunoelektrophoretischen Befunde stimmen mit entsprechenden Ergebnissen der einschlägigen Literatur^{2a, 3, 5, 6, 8, 19, 22a, 23, 25, 31} weitgehend überein. In den pathologischen Sputen konnten vor Mucolyse maximal 6 Eiweissindividuen nachgewiesen werden. Quantitativ am stärksten traten dabei das Albumin, das Transferrin sowie γ A- und γ G-Globulin in Erscheinung. γ M war in diesen Sputumproben nicht nachweisbar. Unter den anodisch gewanderten Komponenten fiel das relativ stark ausgeprägte Präalbumin I auf. Im Vergleich hierzu fanden sich im Sputumpool der Gesunden vor Sekretolyse nur eine Komponente mit der Beweglichkeit des Albumins sowie γ A-Globulin.

Unter Sekretolyse kam es insgesamt zu einer quantitativ stärkeren Darstellung des γ -Globulinsystems, wobei hier wiederum γ A- aber auch γ G-Globulin die Hauptvertreter darstellten. γ M war in nur 2 Fällen schwach nachweisbar.

Die vorliegenden Befunde nach Sekretolyse entsprechen weitgehend den Ergebnissen anderer Autoren^{5, 6, 23}. Sie wurden von den meisten Untersuchern dahingehend interpretiert, dass unter Sekretolyse nicht nur eine Liberierung von fermentativ wirk-

samen bzw. mucolytischen Substanzen aus den Schleimhautzellen erfolgt, sondern dass gleichzeitig eine Aktivierung der Zellfunktionen i. S. einer de-novo-Synthese der vermehrt nachgewiesenen Substanz in Gang gebracht wird.

Dieser Mechanismus wird u.a. auch auf die in der Tracheobronchialschleimhaut nachweisbaren Plasmazellen übertragen. Auf Grund der Untersuchungsergebnisse von Dennis und Mitarb.⁸, von Martinez-Tello und Mitarb.²¹, Tomasi und Mitarb.³⁴ sowie von Rossen und Mitarb.²⁸ produzieren die Plasmazellen der Bronchialschleimhaut zur Hauptsache γ A-Globulin, welches sich allerdings vom IgA des menschlichen Serums durch seine Sedimentationskonstante ($S_{20} 11$ anstatt $S_{20} 7$) unterscheidet. Es wird, wie dargelegt, unter Sekretolyse tatsächlich vermehrt abgeschieden. Ob es sich bei der im Sputum nach Sekretolyse gefundenen γ -Globulinzunahme um eine zell-induzierte Anreicherung handelt, oder ob sie als Ausdruck einer banalen Freisetzung durch Änderung der Permeabilitätsverhältnisse aufzufassen ist, kann allein aus den vorliegenden Befunden nicht entschieden werden. Desgleichen scheint es noch nicht geklärt, ob aus dieser γ -Globulinanreicherung auf eine Stimulierung einer lokalen immunologischen Abwehrreaktion geschlossen werden darf. Die Freisetzung von Immunglobulinen wäre demnach zwar als Indikator für die Funktionstüchtigkeit der immunologisch aktiven Zellen der Tracheobronchialschleimhaut anzusehen, sie würde aber gleichzeitig als Verlust für die Bronchialmucosa selbst zu werten sein. Hinzu kommt, dass die Immunglobuline in isolierter Form nur im Rahmen anaphylaktischer Reaktionsabläufe i. S. einer Antigen-Antikörper-Reaktion wirksam sind, wohin gegen sich alle anderen Antigen-Antikörper-Reaktionen am zellgebundenen Immunglobulin vollziehen.

Beziehungen zwischen dem individuellen Verteilungstyp der Serumproteine und dem Proteinmuster des Sputums konnten nicht aufgezeigt werden. Es ist nicht sicher auszuschliessen, dass die Sputumproteine unter Sekretolyse durch Serumproteine, etwa aus den submucös gelegenen Gefässen oder auch aus den Alveolar-kapillaren mitgeprägt wurden. Es muss jedoch auf Grund der vorliegenden Ergebnisse angenommen werden, dass die Proteinkonstellation des Bronchialschleimhautsekrets zur Hauptsache vom Funktionszustand der Schleimhautzellen bestimmt wird und allenfalls durch Sekundärfaktoren, wie lokale Entzündungsreaktionen, variiert werden kann^{2a, 27}.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurden die Sputumproben von 20 Patienten mit Asthma bronchiale sowie der Sputumpool von 10 Gesunden vor und nach Sekretolyse untersucht. Jede Sputumprobe wurde homogenisiert, agaroelektrophoretisch getrennt und in Kombination mit biochemischen und immunologischen Methoden näher charakterisiert.

Als Ergebnis konnte festgestellt werden, dass nach Sekretolyse eine Anreicherung der löslichen Sputumkonstituenten mit relativ stärkerer Vermehrung der γ -Globuline auf Kosten weit anodisch gewanderter Proteine (Albumine und α -Globuline) in Erscheinung trat. Bei diesen vermehrt nachgewiesenen Proteinkonstituenten handelte es sich vor allem um PAS-färbbare Fraktionen sowie um Komponenten mit LDH- und Esteraseaktivität, sowie um einzelne Immunglobuline, vor allem IgA, aber auch IgG.

Die Befunde wurden unter Berücksichtigung des einschlägigen Schrifttums diskutiert.

LITERATUR

- 1 V. BALDAMUS UND G. GRIES, *Therap. Umschau*, 22 (1965) 362.
- 2 G. BISERTE, R. HAVEZ UND R. CUVELIER, (a) *Exposés Ann. Biochem. Med.*, 24 (1963) 85; (b) Zitiert in (30).
- 3 T. D. BROGAN, *Brit. J. Exptl. Pathol.*, 41 (1960) 288.
- 4 S. C. BUKANTZ UND A. W. BERNIS, (a) *J. Allergy*, 29 (1959) 29; (b) *Amer. Rev. Respirat. Diseases*, 85 (1962) 351.
- 5 H. BÜRGI und L. REGLI, *Therap. Umschau*, 24 (1967) 116.
- 6 W. BÜRGI, H. BÜRGI UND E. LANDIS, *Med. Thorac.*, 24 (1967) 379.
- 7 R. CUVELIER, *Thesis, Lille, 1963: Étude des Glycoprotéines de l'expectoration.*
- 8 E. G. DENNIS, M. M. HORN BROOK UND K. ISHIZAKA, *J. Allergy*, 35 (1964) 464.
- 9 H. EIGELREITER, Zitiert in (5).
- 10 CH. GERNEZ-RIEUX, G. BISERTE, C. VOISIN, R. HAVEZ, P. DELAHOUSSE UND R. CUVELIER, *Sel. Papers Royal Netherl. Tuberc. Assoc.*, 3 (1962) 35.
- 11 R. GIESEKING UND V. BALDAMUS, *Beitr. Klin. Erforsch. Tuberk. Lungenkrankh.*, 137 (1968) 1.
- 12 H. GÖTZ, G. BERG UND F. SCHEIFFARTH, *Z. Immunitätsforsch.*, 114 (1957) 72.
- 13 H. GÖTZ, F. SCHEIFFARTH UND D. HOFMANN, *Z. Gastroenterol.*, 2 (1964) 76.
- 14 H. GÖTZ, H. WÜST UND R. RAIES, *Clin. Chim. Acta*, 19 (1968) 235.
- 15 P. GRABAR UND P. BURTIN, (a) *Analyse Immuno-électrophorétique; Application avec Liquides Biologiques Humains*, Masson, Paris, 1960; (b) *Immunoélectrophoretische Analyse*, Elsevier, Amsterdam, 1964.
- 16 P. GRABAR UND C. A. WILLIAMS, *Biochim. Biophys. Acta*, 10 (1953) 193.
- 17 H. J. VAN DER HELM, *Clin. Chim. Acta*, 7 (1962) 359.
- 18 N. HENNING, *Klinische Laboratoriumsdiagnostik*, 3. Aufl., Bluteiweiss, Urban u. Schwarzenberg, München und Berlin, 1966, S. 60.
- 19 R. I. KEIMOWITZ, *J. Lab. Clin. Med.*, 63 (1964) 54.
- 20 J. KOHN, (a) *Biochem. J.*, 65 (1957) 9; (b) *Clin. Chim. Acta*, 2 (1957) 297; (c) *Ärztl. Lab.*, 10 (1964) 233.
- 21 F. J. MARTINEZ-TELLO, D. G. BRAUN UND W. A. BLANC, *J. Immunol.*, 101 (1968) 989.
- 22 P. MASSON, J. F. HEREMANS UND J. PRIGNOT, (a) *Biochim. Biophys. Acta*, 11 (1965) 466; (b) *Experientia*, 21 (1965) 604.
- 23 H. MAURER, *Deut. Med. J.*, 19 (1968) 634.
- 24 H. R. MAURER, *Disk-Elektrophorese*, De Gruyter u. Co., Berlin, 1968, S. 71.
- 25 H. MAURER UND G. HEINEN, *Arch. Klin. Exptl. Ohren-, Nasen-Kehlkopf-Heilk.*, 188 (1967) 552.
- 26 CH. NADOLNY UND M. BÜCHNER, *Deut. Gesundheitsw.*, 16 (1961) 1023.
- 27 R. NICOLAS, *Med. Thorac.*, 21 (1964) 223.
- 28 R. D. ROSSEN, C. MORGAN, K. C. HSU, W. T. BUTLER UND H. M. ROSE, *J. Immunol.*, 100 (1968) 706.
- 29 J. J. SCHEIDEGGER, (a) *Intern. Arch. Allergy*, 7 (1955) 103; (b) *Semaine Hôp., Paris*, 31 (1956) 2119.
- 30 F. SCHEIFFARTH UND H. GÖTZ, *Klin. Wochschr.*, 42 (1964) 130.
- 31 F. SCHEIFFARTH, H. GÖTZ UND S. EBERT, *Clin. Chim. Acta*, 14 (1966) 519.
- 32 H. E. SCHULTZE UND J. F. HEREMANS, *Molecular Biology of Human Proteins*, Section IV, Chapter 6, *The Proteins of Respiratory Secretion*, Elsevier, Amsterdam-London-New York, 1966, S. 816.
- 33 K. SCHWICK UND K. STÖRIKO, *Lab. Blätter, Behringwerke*, Marburg/Lahn, Mai 1963, S. 61.
- 34 TH. B. TOMASI, JR., E. M. TAN, A. SOLOMON UND R. A. PRENDERGAST, *J. Exptl. Med.*, 121 (1965) 101.
- 35 J. URIEL, Zitiert in (15 a, b); *Ann. Inst. Pasteur*, 101 (1961) 104.
- 36 J. URIEL UND P. GRABAR, *Ann. Inst. Pasteur*, 90 (1956) 429.
- 37 L. E. WARFVINGE, *Acta Med. Scand.*, 153 (1955) 49.
- 38 C. A. WILLIAMS UND P. GRABAR, (a) *J. Immunol.*, 74 (1955) 158; *J. Immunol.*, 74 (1955) 397.

Clin. Chim. Acta, 30 (1970) 53-64

Lebenslauf

Am 12. 5. 1943 wurde ich als Sohn des Schriftleiters Hans-Richard Fischer und seiner Ehefrau Barbara, geb. Gembs, in Gera geboren. Kurz vor Kriegsende zog meine Mutter mit mir nach Hohenpözl/Fränk. Jura, wo ich 1949 eingeschult wurde. Im Oktober 1949 zogen wir nach Bamberg. Ab September 1953 besuchte ich das Neue Gymnasium Bamberg und legte im Juli 1962 mein Abitur ab.

Im Oktober 1962 trat ich als Freiwilliger in die Bundeswehr ein und wurde im September 1964 als Leutnant d. R. entlassen.

Ab November 1964 war ich Student der Medizin an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg und habe hier im Mai 1967 die ärztliche Vorprüfung sowie am 27. 7. 1970 das medizinische Staatsexamen bestanden.

